

REVISIÓN

Valoración de la enfermedad por hígado graso no alcohólico desde el laboratorio clínico[☆]



Iria Cebreiros López^{*} y José Antonio Noguera Velasco

Servicio Análisis Clínicos, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia, España

Recibido el 2 de junio de 2017; aceptado el 30 de octubre de 2017

Disponible en Internet el 6 de diciembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Enfermedad por hígado graso no alcohólico;
Esteatohepatitis no alcohólica;
Biomarcadores

Resumen La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) afecta aproximadamente a entre el 20% y el 30% de la población general, y su relevancia clínica es debida a que una parte de estos sujetos desarrolla esteatohepatitis no alcohólica que puede progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular. Actualmente la biopsia hepática es el estándar de referencia para el diagnóstico y la estratificación de la EHGNA, pero sin embargo, los riesgos y limitaciones asociados a este procedimiento, junto con la alta y creciente prevalencia de la EHGNA han desencadenado una búsqueda intensiva de métodos alternativos no invasivos para la evaluación de esta enfermedad. Dentro de estos métodos destacan los biomarcadores de laboratorio, que se han convertido en una opción prometedora por su carácter no invasivo y su reproducibilidad. Esta revisión pretende exponer los conocimientos actuales sobre el papel de los biomarcadores en el manejo de la EHGNA.

© 2017 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Non-alcoholic fatty liver disease;
Non-alcoholic steatohepatitis;
Biomarkers

Assessment of non-alcoholic fatty liver disease from the clinical laboratory

Abstract Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) affects approximately 20% to 30% of the general population, and its clinical relevance is due to the fact that a percentage of these subjects develop non-alcoholic steatohepatitis that can progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Currently the liver biopsy is the reference standard for the diagnosis and stratification of NAFLD, but the risks and limitations associated with this procedure, together with the high and increasing prevalence of NAFLD, have triggered an intensive search for alternative non-invasive methods for the evaluation of this disease. Among these methods are the

[☆] Esta revisión corresponde a la memoria presentada por Iria Cebreiros López, al finalizar la Beca AEFA posresidencia que disfrutó durante el año 2016.

^{*} Autor para correspondencia.

Correo electrónico: iriacebreiros@hotmail.com (I. Cebreiros López).

laboratory biomarkers, which have become a promising option due to their non-invasive nature and reproducibility in their measurement. This review aims to present current knowledge on the role of biomarkers in the management of non-alcoholic steatohepatitis.

© 2017 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es un término genérico que se refiere a un amplio espectro de lesiones hepáticas que aparecen en ausencia de ingesta de alcohol, y que van desde la esteatosis simple sin lesiones necroinflamatorias significativas, hasta un patrón complejo denominado esteatohepatitis, que incluye lesiones activas de daño hepatocitario, apoptosis, muerte celular e inflamación. La esteatohepatitis es una enfermedad hepática crónica que puede evolucionar a fibrosis, cirrosis y enfermedad hepática terminal.

En la EHGNA tienen lugar una serie de alteraciones de factores locales y sistémicos, que controlan el equilibrio entre el aflujo, la oxidación y la exportación de lípidos, lo que conduce a la acumulación hepática de triglicéridos. Es un proceso complejo, y solo parcialmente conocido, pero en el que sabe que desempeñan un papel fundamental la inflamación y la resistencia a la insulina.

La EHGNA es el trastorno hepático más frecuente en los países industrializados occidentales, y tiene una prevalencia del 6% al 35% en todo el mundo. En Europa, la prevalencia media es del 25-26% con amplias variaciones en diferentes poblaciones. La incidencia de la enfermedad ha aumentado de manera significativa en los últimos años, en paralelo con el aumento de la prevalencia de la obesidad^{1,2}.

Epidemiología

Los estudios de población han demostrado que la EHGNA está fuertemente asociada con la obesidad central, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la dislipidemia y la resistencia a la insulina. Es frecuente la asociación de diversos de estos factores y, dentro de estos, los predictores más importantes de fibrosis son la edad, la obesidad y la DM. Como tal, la EHGNA puede ser considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico³.

Fisiopatología

Desde el punto de vista fisiopatogénico la teoría más aceptada como causante de la enfermedad es la del «doble impacto» propuesta por Day y James⁴. Según este modelo, el primer golpe implica la acumulación de lípidos en los hepatocitos debido a un desequilibrio en la homeostasis de los triglicéridos, lo cual conduce al desarrollo de esteatosis hepática, considerado el marcador patognomónico de la enfermedad. Posteriormente, el segundo golpe equivale al desarrollo de estrés metabólico-oxidativo y a la producción

descontrolada de citoquinas como intento de compensar la alteración de la homeostasis lipídica, que provocan inflamación, necrosis y activación de la cascada fibrogénica, promoviendo por tanto progresión de la lesión hepática.

En la EHGNA la acumulación de grasa en el hígado es el resultado de una mayor liberación de ácidos grasos libres (AGL) al hígado, del aumento de la síntesis y disminución de la exportación de triglicéridos a través de lipoproteínas de muy baja densidad y de la reducción de la beta-oxidación. Generalmente, los pacientes con EHGNA tienen resistencia a la insulina, lo que provoca un aumento de la lipólisis del tejido adiposo. Los AGL resultantes serán absorbidos por el hígado, pudiendo causar peroxidación lipídica, que aumentará la producción de citoquinas proinflamatorias⁵.

La lipogénesis *de novo*, debida a la hiperinsulinemia asociada a la resistencia a la insulina, también contribuye a la esteatosis aumentando la producción y almacenamiento de triglicéridos. La hiperinsulinemia además puede causar una reducción de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad, lo que conduce a la acumulación hepática de triglicéridos.

La presencia de inflamación o esteatohepatitis depende de una serie de factores tales como la presencia de AGL, citoquinas proinflamatorias y adipoquinas, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. En la [figura 1](#) se puede apreciar esquemáticamente la fisiopatogenia de la EHGNA.

El hallazgo anatomopatológico más común descrito en la enfermedad es la presencia de esteatosis hepática, que se presenta con diferentes grados de gravedad casi en el 100% de los casos. Además, el amplio espectro de esta enfermedad incluye la presencia de esteatohepatitis y fibrosis en el caso de enfermedad avanzada.

En la EHGNA la progresión de la lesión hepática depende del daño histológico en el momento del diagnóstico, así la esteatosis hepática generalmente presenta un curso clínico benigno y carácter reversible, mientras que la presencia de esteatohepatitis o fibrosis están vinculadas con un peor pronóstico de la enfermedad relacionado con el desarrollo de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. De entre los pacientes con esteatohepatitis un 25-35% desarrollan fibrosis progresiva, entre el 65-75% permanecen estables o presentan regresión de la fibrosis y entre el 9-20% progresan a cirrosis^{6,7}.

Estos datos sugieren la importancia y la necesidad de establecer un seguimiento protocolizado de los pacientes con EHGNA, para detectar de manera precoz la presencia de esteatohepatitis y/o fibrosis, estableciendo por tanto una población de riesgo con mayor probabilidad de evolucionar a cirrosis y hepatocarcinoma.

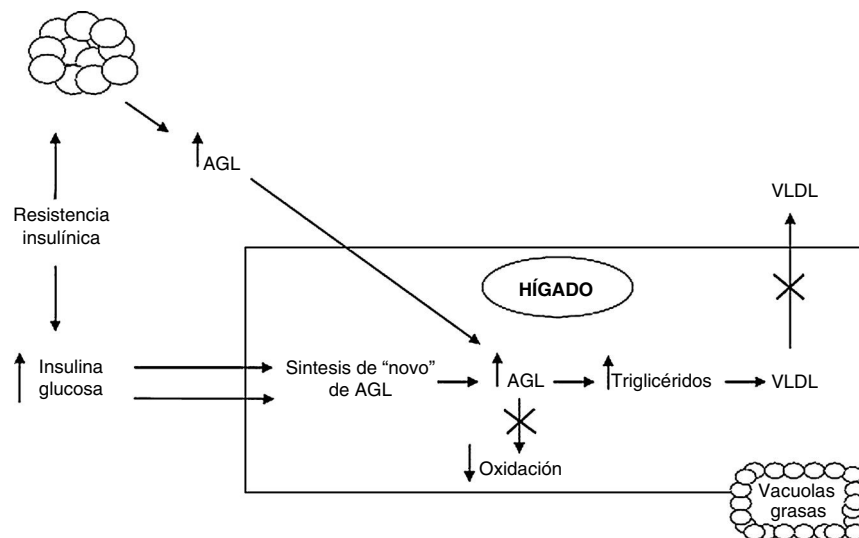


Figura 1 Fisiopatología de la EHGNA.

AGL: ácidos grasos libres; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad.

Diagnóstico

Los sujetos con EHGNA están en su mayoría asintomáticos, aunque pueden mostrar manifestaciones clínicas inespecíficas como fatiga, malestar general o dolor en el hipocondrio derecho. En ocasiones existe solo hepatomegalia, sin ictericia, y los datos de esplenomegalia o signos clínicos de hipertensión portal son muy raros. De ahí que casi siempre se sospeche el diagnóstico por la presencia de alteraciones ecográficas o de los resultados de laboratorio descubiertos de manera accidental.

Deben excluirse otras causas de hepatopatía, especialmente las hepatitis virales y el alcoholismo, por ser las más prevalentes en nuestro medio. La ausencia de consumo de alcohol es una de las características definitorias de esta entidad, pero es difícil de establecer con seguridad, motivo por el que se usan con frecuencia cuestionarios específicos o, incluso, combinaciones de datos analíticos.

En la actualidad, para el diagnóstico de la EHGNA se dispone básicamente de la biopsia hepática, técnica de referencia y de métodos no invasivos representados por las técnicas de imagen y los biomarcadores de laboratorio.

Biopsia hepática

La biopsia hepática es el estándar de referencia para el diagnóstico de la EHGNA, ya que confirma los hallazgos histológicos típicamente descritos en la enfermedad y permite su estratificación. Sin embargo, es un procedimiento invasivo, que implica por tanto un riesgo bajo pero real de morbilidad. Además del riesgo de eventos adversos la biopsia hepática presenta ciertas limitaciones inherentes al procedimiento, tales como el error de muestreo y la variabilidad intra e interobservador. Otras limitaciones no menos importantes son su elevado coste y una baja aceptación por parte de los pacientes, que en ocasiones conlleva demoras terapéuticas⁸.

Estas razones justifican que la biopsia no pueda utilizarse como procedimiento de cribado en el gran número de pacientes con sospecha de EHGNA, ni tampoco para realizar el seguimiento de los pacientes ya diagnosticados, quedando su uso limitado a pacientes muy seleccionados^{9,10}. Es por ello que en los últimos años se ha potenciado el desarrollo de técnicas no invasivas, fundamentalmente biomarcadores y estudios de imagen.

Técnicas de imagen

De entre las técnicas de imagen la ecografía es la técnica de cribado más comúnmente utilizada en la práctica clínica rutinaria cuando existe sospecha de EHGNA, debido especialmente a su bajo coste y a su accesibilidad. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica es baja en estadios leves de la enfermedad y para diferenciar estadios intermedios¹¹.

Han cobrado especial relevancia en los últimos años técnicas de imagen como el Fibroscan® o el ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse*; técnica de radiación acústica de la fuerza del impulso), basadas en la medición de la rigidez hepática mediante ultrasonidos. Estas técnicas, aunque con sus limitaciones, han mostrado buenos resultados en la evaluación de la EHGNA^{9,12}.

Otras técnicas de imagen, aunque por el momento apenas utilizadas en la práctica clínica para el diagnóstico de la EHGNA, son la tomografía computarizada o la resonancia magnética (RM). Aunque la tomografía computarizada se considera una técnica fiable para evaluar la esteatosis su uso es limitado por la exposición a la radiación. Dentro de la RM existe una modalidad llamada «elastografía de resonancia magnética» (elasto-RM), que produce imágenes codificadas a color que indican la elasticidad de los tejidos. Esta técnica aporta buenos resultados, pero las principales limitaciones son su elevado coste, su poca disponibilidad y que, en ocasiones, es mal tolerada por los pacientes^{13,14}.

Biomarcadores

Los biomarcadores se muestran como una opción muy prometedora para la valoración de la EHGNA, fundamentalmente por su naturaleza no invasiva, así como por la posibilidad de automatización y su reproducibilidad. A continuación se exponen algunos de los principales biomarcadores que se han evaluado en el contexto de esta enfermedad.

Pruebas de función hepática

Aunque un porcentaje bastante elevado de los pacientes con EHGNA pueden tener las pruebas de función hepática normales, dentro del patrón característico del laboratorio se encuentran la elevación moderada de la aspartato aminotransferasa (AST; EC 2.6.1.1.) y la alanina aminotransferasa (ALT; EC 2.6.1.2), que refleja un daño hepatocelular inespecífico. En la EHGNA, y más específicamente en la esteatohepatitis no alcohólica, los niveles de aminotransferasas pueden elevarse de 2 a 4 veces sobre el límite superior de normalidad, siendo la ALT más alta que la AST, en contraste con la esteatohepatitis alcohólica^{15,16}.

Los niveles altos de fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1.) y γ -glutamilttransferasa (GGT; EC 2.3.2.2.) también son comunes, detectándose en el 25-75% de los pacientes, situándose los niveles entre 1,5 y 3 veces el límite superior de la normalidad. La bilirrubina y la albúmina suelen permanecer normales hasta etapas avanzadas de la hepatopatía¹⁷.

Los trastornos en la hemostasia, debidos a la disminución de la capacidad sintética del hígado de los factores de la coagulación, no se manifiestan generalmente hasta alcanzar el estadio de cirrosis hepática. En las etapas previas de la enfermedad no se observan alteraciones hemostásicas debido a la gran reserva funcional de las proteínas de la coagulación existente en el hígado.

Si bien todas estas alteraciones no son específicas, ni tampoco suficientemente sensibles para detectar la enfermedad en estadios iniciales, sí ayudan a excluir otras causas potenciales de enfermedad hepática después de descartar alcoholismo y marcadores virales positivos.

Biomarcadores de fibrosis

La fibrosis hepática es la formación y acumulación patológica de matriz extracelular por las células estrelladas en respuesta a una lesión hepática crónica. El grado y la tasa de progresión de la fibrosis hepática se consideran actualmente los determinantes más importantes de la evolución y el pronóstico de los pacientes con EHGNA. Esta es la razón por la cual los primeros biomarcadores que se utilizaron en la EHGNA fueron los que estimaban el grado de fibrosis hepática y que, generalmente, se habían evaluado inicialmente en pacientes con hepatitis virales (particularmente con hepatitis por virus C). Existe una amplia variedad de este tipo de biomarcadores, utilizados de manera aislada, o más frecuentemente combinados mediante algoritmos matemáticos. A continuación se describen algunos de los más relevantes.

En 2007 se desarrolló el algoritmo NAFLD Fibrosis Score (NFS) en un estudio llevado a cabo en una población de pacientes con EHGNA diagnosticada mediante biopsia, con el objetivo de identificar a aquellos con fibrosis

avanzada¹⁸. El índice incluye los parámetros edad, índice de masa corporal, presencia de DM o alteración de la glucosa en ayunas, relación AST/ALT, recuento de plaquetas y albúmina. Una puntuación por debajo de -1,455 tiene un valor predictivo negativo alto para excluir fibrosis avanzada, mientras que una puntuación por encima de 0,676 predice fibrosis avanzada. Los autores recomiendan que únicamente los pacientes cuya puntuación se sitúe en el rango intermedio deben someterse a biopsia hepática, evitando así alrededor del 75% de las biopsias. En un metaanálisis de 2011 que evaluó diversos estudios llevados a cabo en pacientes con EHGNA¹⁹ se reflejó un área bajo la curva ROC (*receiver operation characteristics*; AUROC) y una sensibilidad y especificidad del NAFLD Fibrosis Score para la detección de fibrosis avanzada de 0,85, 90% y 97%.

Otro algoritmo simple que se desarrolló para excluir la presencia de fibrosis avanzada en pacientes con EHGNA es el BARD (de las siglas en inglés de *body mass index [BMI]; aspartate transaminase/alanine aminotransferase ratio [AAR] y diabetes mellitus [DM]*). Se basa en 3 variables combinadas en una suma ponderada (el índice de masa corporal ≥ 28 representa 1 punto, la relación AST/ALT $\geq 0,8$ representa 2 puntos y la DM representa 1 punto). Una puntuación de 2-4 tuvo una *odds ratio* de 17 (intervalo de confianza: 9,2-31,9) para determinar la fibrosis avanzada y un valor predictivo negativo del 96%²⁰.

El índice APRI (AST to Platelet Ratio Index; índice AST/plaquetas) se calcula utilizando los niveles de AST y el recuento de plaquetas. En un estudio reciente²¹ en el que participaron 358 pacientes con EHGNA diagnosticada mediante biopsia, el AUROC, la sensibilidad y la especificidad del APRI (para un punto de corte > 1) para la detección de fibrosis significativa fueron respectivamente: 0,67, 30% y 93%.

El índice FIB-4, diseñado inicialmente en una población de pacientes con virus de la hepatitis C, incluye el recuento de plaquetas, ALT, AST y edad. Posteriormente se ha evaluado en pacientes con EHGNA, encontrando un AUROC para el diagnóstico de fibrosis avanzada de 0,871. Se plantean 2 puntos de corte, de tal manera que los valores por debajo del punto inferior (1,45) permiten excluir fibrosis avanzada (sensibilidad 74%, especificidad 71%) y los valores por encima del punto de corte superior (3,25) indican la presencia de fibrosis avanzada (sensibilidad 26%, especificidad 98%)²².

El *Enhanced Liver Fibrosis test* (ELF) es una versión simplificada del panel original ELF (OELF) cuya utilidad diagnóstica ha sido validada para la detección de fibrosis en una amplia variedad de trastornos hepáticos. La prueba ELF es un algoritmo que incluye 3 biomarcadores, el ácido hialurónico (HA), el propéptido aminoterminal del procólgeno tipo III (PIIINP) y el inhibidor tisular de la metaloproteínasa 1 (TIMP-1). En el primer estudio de validación del test ELF en una población de pacientes con EHGNA se establecieron 3 puntos de corte: 0,3576 para la detección de fibrosis avanzada (AUROC 0,90), -0,1068 para fibrosis significativa (AUROC 0,82) y -0,2070 para ausencia de fibrosis (AUROC 0,76)²³.

El índice Hepascore incluye la edad, el sexo, la bilirrubina, la γ -glutamilttransferasa, el ácido hialurónico y la α 2-macroglobulina. El algoritmo ha sido valorado en

Tabla 1 Índices matemáticos para la estimación del grado de fibrosis en pacientes con EHGNA

Índices matemáticos	Variables incluidas	Puntos de corte	Referencia
NFS	Edad, IMC, DM o alteración de la glucosa en ayunas, AST/ALT, plaquetas y albúmina	$\leq 1,455$: ausencia de fibrosis avanzada (S: 82%, E: 77%, VPP: 56%, VPN: 93%) > 0,676: presencia de fibrosis avanzada (S: 51%, E: 98%, VPP: 90%, VPN: 85%)	Angulo et al. ¹⁸
BARD	IMC, AST/ALT, DM	2-4: fibrosis avanzada (AUROC: 0,81, VPP: 43%, VPN: 96%)	Harrison et al. ²⁰
APRI	AST, plaquetas	> 1: fibrosis significativa (AUROC: 0,67, S: 30% y E: 93%)	Tapper et al. ²¹
FIB-4	Plaquetas, ALT, AST, edad	< 1,45: ausencia de fibrosis avanzada (AUROC: 0,87, S: 74%, E: 71%, VPP: 90%, VPN: 64%) > 3,25: presencia de fibrosis avanzada (AUROC: 0,87, S: 26%, E: 98%, VPP: 48%, VPN: 95%)	Sumida et al. ²²
ELF	HA, PIIINP, TIMP-1	0,3576: presencia de fibrosis avanzada (AUROC: 0,90, S: 80%, E: 90%, VPP: 71%, VPN: 94%) -0,1068: presencia de fibrosis significativa (AUROC: 0,82, S: 70%, E: 70%, VPP: 70%, VPN: 80%) -0,2070: ausencia de fibrosis (AUROC: 0,76, S: 61%, E: 80%, VPP: 81%, VPN: 79%)	Guha et al. ²³
Hepascore	Edad, sexo, bilirrubina, GGT, HA, $\alpha 2$ -macroglobulina	0,37: fibrosis significativa (AUROC: 0,73, S: 50,5%, E: 88,3%) 0,44: fibrosis avanzada (AUROC: 0,81, S: 75,5%, E: 84,1%) 0,70: cirrosis (AUROC: 0,90, S: 87%, E: 89%)	Kaswala et al. ²⁴
FibroMeter™-EHGNA	Edad, peso corporal, ferritina, plaquetas, AST, ALT, glucosa en ayunas	0,490: fibrosis significativa (AUROC: 0,94, S: 78,5%, E: 95,9%, VPP: 87,9%, VPN: 92,1%)	Calès et al. ²⁵
FibroTest™	Sexo, bilirrubina, GGT, ApoA1, haptoglobina, $\alpha 2$ -macroglobulina	0,30: fibrosis avanzada (AUROC: 0,86, S: 77%, E: 77%, VPP: 54%, VPN: 90%)	Ratzu et al. ²⁶

ALT: alanino aminotransferasa; ApoA1: apolipoproteína A1; AST: aspartato aminotransferasa; AUROC: área bajo la curva ROC; DM: diabetes mellitus; E: especificidad; GGT: γ -glutamilttransferasa; HA: ácido hialurónico; IMC: índice de masa corporal; PIIINP: propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III; S: sensibilidad; TIMP-1: inhibidor tisular de la metaloproteína 1.

pacientes con EHGNA, demostrando su capacidad para la identificación de pacientes con fibrosis significativa (AUROC, sensibilidad y especificidad de 0,73, 50,5% y 88,3%), fibrosis avanzada (0,81, 75,5% y 84,1%) y cirrosis (0,90, 87% y 89%)²⁴.

También se han desarrollado paneles patentados para evaluar la fibrosis en la EHGNA. Es el caso de FibroMeter™-EHGNA, que incluye 7 variables (edad, peso corporal, ferritina, plaquetas, AST, ALT y glucosa en ayunas) y FibroTest™, que se basa en la combinación de edad, sexo, bilirrubina, γ -glutamilttransferasa, apolipoproteína A1, haptoglobina y $\alpha 2$ -macroglobulina. Ambos aportan valores óptimos de AUROC para la detección de fibrosis (0,94 Fibrometer y 0,86 Fibrotest)^{25,26}.

En la [tabla 1](#) puede observarse de manera resumida el rendimiento diagnóstico de los distintos índices matemáticos para la estimación del grado de fibrosis.

Glicobiología

La glicosilación es la modificación postraducciona de proteínas secretadas con restos de hidratos de carbono que puede provocar cambios estructurales, así como en las interacciones celulares, la solubilidad y la unión a receptores. Debido a que muchas proteínas glicosiladas en el suero se generan en el hígado, se espera que una función hepática disminuida se relacione con los cambios en la glicosilación de proteínas, y estudios recientes sugieren que el N-glicol sérico puede ser un biomarcador valioso de enfermedad hepática crónica^{27,28}.

De acuerdo con las diferencias en los patrones de N-glicosilación se han identificado 2 biomarcadores, el GlycoCirrhoTest y el GlycoFibroTest, para predecir la presencia de cirrosis y fibrosis respectivamente^{29,30}, por lo que podrían ser útiles en la identificación de estadios avanzados de la EHGNA.

Marcadores de inflamación

Teniendo en cuenta la fisiopatología de la EHGNA se ha evaluado la utilidad de diversos biomarcadores de inflamación para la valoración de la enfermedad, incluyendo citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleuquina 6 (IL-6), así como la proteína C reactiva ultrasensible (hs-CRP) o la ferritina. La supresión de la señalización de citoquinas regula negativamente los receptores hepatocelulares de insulina y promueve la resistencia a la insulina hepática adquirida. Otras moléculas relacionadas con la inflamación hepática, como es la enzima cathepsina D, también se han identificado como posibles biomarcadores para la valoración de esta enfermedad.

Existe una fuerte asociación entre la IL-6 y la EHGNA³¹, sin embargo la IL-6 se eleva en varias afecciones inflamatorias incluyendo resistencia a la insulina y desencadena fibrosis en múltiples órganos. Se ha demostrado que la IL-6 es significativamente mayor en los pacientes con EHGNA en comparación con población sana, sin embargo se observan resultados contradictorios cuando se comparan los niveles de IL-6 entre los pacientes con esteatosis simple y aquellos con esteatohepatitis^{32,33}. Así, el papel de la IL-6 parece útil en la confirmación del diagnóstico de la enfermedad, mientras que su papel como marcador de estadificación es menos claro.

El TNF- α está implicado en la patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica, encontrándose sus niveles significativamente aumentados en estos pacientes con respecto a aquellos con esteatosis simple y en los controles sanos^{33,34}.

La ferritina es una proteína intracelular que se une al hierro y lo libera de manera controlada. El nivel de ferritina aumenta en respuesta a la infección y a la inflamación. La ferritina sérica es un predictor independiente de fibrosis hepática avanzada en pacientes con EHGNA³⁵. Otro marcador genérico de inflamación, la PCR, ha mostrado una asociación con la esteatohepatitis no alcohólica³⁶.

Más recientemente se ha identificado que los niveles plasmáticos de la enzima lisosómica cathepsina D, implicada en el procesamiento de las lipoproteínas ricas en colesterol, se incrementan de manera significativa en los pacientes con esteatohepatitis en comparación con los pacientes con un hígado sano o esteatosis simple. Además, los niveles de esta enzima correlacionan de manera específica con el grado de severidad de la EHGNA, incluso en las etapas iniciales de la enfermedad. Por otra parte, en pacientes con EHGNA sometidos a cirugía bariátrica se comprobó que después de la intervención, la cathepsina D disminuyó de manera significativa paralelamente a la mejoría en el grado de hepatopatía. Estos datos sugieren que esta enzima podría utilizarse en el diagnóstico y seguimiento de la EHGNA³⁷.

Marcadores de apoptosis

La citoqueratina 18 (CK-18) es la principal proteína de filamento intermedio del hígado. Las caspasas escinden CK-18 durante la apoptosis de hepatocitos y crean fragmentos de CK-18 que pueden ser detectados por inmunoensayo³⁸. Se considera por tanto un marcador de la apoptosis de los hepatocitos, que aumenta significativamente en la esteatohepatitis no alcohólica en comparación con la esteatosis simple o el hígado sano.

Diversos estudios han mostrado respecto a la CK-18 resultados satisfactorios para la detección de esteatohepatitis no alcohólica, pero sin embargo se observan grandes diferencias en los puntos de corte establecidos, lo que supone un problema para la aplicación clínica. Un metaanálisis que evaluó 11 estudios recientes muestra que el AUROC para la detección de esteatohepatitis varió desde 0,71 a 0,93, con una sensibilidad y especificidad del 66% y 82% respectivamente. Se constató una amplia variación en los valores de corte reportados por cada investigador (punto de corte óptimo entre 136-338 U/l)³⁸. Además, sus niveles plasmáticos están alterados en varias afecciones inflamatorias que implican respuesta apoptótica, tales como hepatitis viral crónica, enfermedades pulmonares y renales crónicas³⁹. Por estas razones la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades Hepáticas (AASLD) no ha recomendado el uso de CK-18 para el diagnóstico de la esteatohepatitis no alcohólica.

Adipoquinas

La asociación entre la obesidad y la EHGNA está bien descrita. Se sabe que el tejido adiposo segrega varias proteínas bioactivas, que se consideran implicadas en el desarrollo de la enfermedad.

La adiponectina es la proteína más abundante secretada por el tejido adiposo y tiene funciones en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Su secreción es estimulada por la insulina y es inducida durante la diferenciación de las células grasas. Los niveles circulantes de adiponectina se asocian negativamente con la resistencia a la insulina, la DM2, la dislipidemia y el síndrome metabólico. Varios estudios han demostrado niveles significativamente más bajos de adiponectina en el suero de pacientes con esteatohepatitis no alcohólica con respecto a pacientes sanos o con esteatosis simple^{16,40}.

Otra adipoquina asociada con la EHGNA es la leptina, una proteohormona de 16 kDa implicada en la regulación de la ingesta de alimentos, el balance energético y el peso corporal. Las concentraciones de leptina en la sangre reflejan la grasa corporal total^{41,42}. Aunque son diversos los estudios que han abordado el papel de la leptina como biomarcador en la EHGNA, los resultados no son concluyentes. Por un lado se ha señalado que los niveles de esta adipoquina son significativamente más altos en los pacientes con EHGNA^{32,40}, pero existen otros estudios que han reportado la ausencia de diferencias entre pacientes y grupo control⁴³. En el trabajo de Lemoine et al.⁴⁰ se indica que la ratio adiponectina/leptina en combinación con la evaluación de la resistencia a la insulina es útil para la predicción de la enfermedad. En otro estudio se ha señalado que los niveles de leptina y adiponectina son predictores independientes de esteatohepatitis no alcohólica en pacientes obesos⁴⁴.

También se ha estudiado la relación de la resistina con la EHGNA, aunque los resultados han mostrado discrepancias en función de los estudios. Por un lado existen publicaciones que ponen de manifiesto la existencia de niveles más altos de esta citoquina en pacientes con EHGNA en estadios avanzados⁴⁵, mientras que otras publicaciones indican que no existen diferencias significativas entre los pacientes con EHGNA y los controles sanos^{46,47}.

Los niveles séricos de la proteína de unión al retinol 4 (RBP4), otra adipocina asociada con resistencia a la insulina, también se han encontrado elevados en los pacientes con EHGA en comparación con los controles⁴⁸.

Está claro que las adipocinas desempeñan un papel en el desarrollo y la patogénesis de la EHGA, pero sin embargo se necesitan más estudios que presenten una evidencia robusta de su utilidad como marcadores de la enfermedad.

Marcadores de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se ha establecido como un factor clave en el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica, aunque las interacciones de este proceso complejo con el desarrollo y la progresión de la enfermedad no se conocen con exactitud. Varios estudios han evaluado marcadores tanto del aumento del estrés oxidativo como de la reducción de la capacidad antioxidante en pacientes con EHGA.

Se ha demostrado que la lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) son significativamente más altos en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica. Además, ambos marcadores se asocian de manera independiente con la resistencia a la insulina y su interacción con las células estrelladas hepáticas favorece el desarrollo de fibrosis^{49,50}.

Por otro lado, se han encontrado niveles más bajos de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (GSH-Px) en pacientes con EHGA^{51,52}.

El citocromo p450 2E1 desempeña un papel importante en el metabolismo de los ácidos grasos y conduce a la formación de peróxidos lipídicos tóxicos. Evidencias recientes muestran correlación positiva entre la actividad del citocromo p450 2E1, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y la resistencia a la insulina, por lo que desempeña un papel importante en el desarrollo y la progresión de la EHGA^{16,53}.

Metabolómica y proteómica

La metabolómica y proteómica son unas de las técnicas más utilizadas para identificar nuevos marcadores de la EHGA. Generalmente se utiliza un enfoque de metabolómica exploratoria mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas de alto rendimiento para identificar metabolitos cuyos niveles difieran en los pacientes con EHGA⁵⁴.

Metabolómica: Mediante análisis metabólico se ha revelado que la EHGA se asocia con mayores concentraciones plasmáticas de homocisteína y cisteína total, y menores concentraciones plasmáticas de glutatión total. Adicionalmente se han encontrado niveles más elevados de glicocolato, taurocolato y glicoconso-desoxicolato. Las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos de cadena larga fueron menores, mientras que las de carnitina libre, butirilcarnitina y metilbutirilcarnitina fueron más altas en la esteatohepatitis no alcohólica⁵⁵.

También mediante enfoque metabólico, Li et al. identificaron los niveles séricos de glucosa, glutamato, lactato y taurina como biomarcadores de EHGA y construyeron un modelo para predecir las diferentes etapas de la progresión de la enfermedad basado en los diferentes niveles de estos biomarcadores en cada individuo⁵⁶.

Proteómica: Los estudios proteómicos usan el reconocimiento de patrones con sustracción. Varios estudios han

reportado diferentes picos de proteínas en el suero de pacientes con esteatohepatitis que difieren de otros que únicamente presentan esteatosis simple^{57,58}.

Dos estudios proteómicos importantes, utilizando tejido hepático y suero de pacientes adultos con y sin EHGA, revelaron una mayor expresión de lumican (un proteoglucano de queratán sulfato implicado en la reticulación del colágeno y la transición epitelial-mesenquimal) en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica^{59,60}.

En otro estudio proteómico se encontró que diversas proteínas se regulan al alza y a la baja en pacientes con EHGA en comparación con sujetos sanos. La apolipoproteína E, la molécula CD5, el complemento C3, la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 3, la proteína de unión a la vitamina D y la proteína citosólica 1 de los linfocitos se incrementaron en el suero de los pacientes con EHGA. Además, la apolipoproteína E, la catalasa, la molécula CD5, la proteína citosólica 1 de los linfocitos y la proteína de unión a la vitamina D se incrementaron en aquellos pacientes con esteatohepatitis en comparación con los que únicamente presentaban esteatosis simple⁶¹.

Genética

Se han constatado variaciones considerables tanto en la gravedad como en la progresión de la EHGA en pacientes con características basales similares, así como diferente prevalencia de la enfermedad en función de la raza, e incluso en determinados individuos parece haber un componente familiar. Estos datos fundamentan la implicación de factores genéticos. Se ha estudiado la asociación entre varias mutaciones y polimorfismos y la sobreexpresión de genes proinflamatorios, proapoptóticos y profibrogénicos, lo que podría condicionar la variabilidad en las manifestaciones clínicas, así como la progresión y el curso de la enfermedad⁶².

El polimorfismo de nucleótido único rs738409 en el gen de la adiponutrina (PNPLA3), ubicado en el cromosoma 22, en que existe una transversión de citosina (C) por guanina (G), la que a su vez codifica la variante I148M (cambio del aminoácido isoleucina por metionina), ha sido identificado como un determinante genético de la EHGA, asociándose a una esteatosis más grave, esteatohepatitis y fibrosis, así como con aumento del riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular^{63,64}.

Otra variante genética en relación con la EHGA descubierta más recientemente es la que ocurre en el gen Transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2), ubicado en el cromosoma 19, y que se ha asociado a la presencia de esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis hepática. El polimorfismo de nucleótido único rs58542926 en el gen de TM6SF2 condiciona una transición de citosina por timina, que a su vez codifica una variante en que glutamato pasa a lisina en el residuo 167 (E167K) de la proteína⁶⁵.

Epigenética

La epigenética, un fenómeno heredable que afecta a la expresión génica sin alterar la secuencia del ADN, proporciona una nueva perspectiva sobre la patogénesis de la EHGA. Los cambios epigenéticos reversibles tienen lugar a nivel transcripcional y proporcionan una conexión fenotípica entre el huésped y el medio ambiente. Existen evidencias que sugieren la importancia del papel de la epigenética en

la EHGNA, pudiendo identificarse en este campo biomarcadores útiles para determinar el riesgo inicial de EHGNA, así como el pronóstico e incluso posibles dianas terapéuticas.

Metilación del ADN: Los patrones de metilación aberrantes del ADN genómico representan uno de los principales cambios epigenéticos que pueden causar la expresión génica anormal en la EHGNA. También se ha sugerido que las variaciones epigenéticas en la metilación del ADN mitocondrial pueden ocurrir durante el desarrollo de la enfermedad.

Estudios epigenómicos han sugerido que las diferencias genéticas de metilación podrían ser útiles para distinguir a los pacientes con esteatohepatitis avanzada de aquellos con esteatosis simple. En los estadios más patológicos de la EHGNA se ha evidenciado que algunos genes reparadores de tejidos se encuentran hipometilados en el hígado, mientras que genes relacionados con rutas metabólicas están hipermetilados. También se han observado diferencias de metilación del ADN en genes pro y anti-fibrogénicos, lo que podría ser útil para predecir la progresión a fibrosis de la EHGNA. Además se ha sugerido que los perfiles de metilación del ADN en genes asociados con la homeostasis lipídica, la fibrosis y la carcinogénesis podrían ser útiles para investigar el papel etiológico de la metilación del ADN en la progresión de la EHGNA^{66,67}.

Modificación de histonas: Se ha señalado que la modificación de histonas, concretamente la acetilación, influye en los perfiles de expresión génica en la EHGNA. De hecho, las modificaciones aberrantes de las histonas promueven el desarrollo de la DM2 junto con la resistencia a la insulina y, en consecuencia, se relacionan con la EHGNA. Esto abre un importante campo de investigación, donde ya se han identificado posibles biomarcadores de susceptibilidad de la enfermedad, así como estrategias terapéuticas potenciales⁶⁷.

MicroARN: Se conoce que los microARN (miR) influyen en la expresión fenotípica mediante la modulación de la expresión génica y recientemente se han propuesto como biomarcadores potenciales y dianas terapéuticas atractivas para la EHGNA.

Son muchos los miR estudiados en este ámbito, de entre los que destacaremos la correlación negativa existente entre el nivel de expresión de miR-122 y el grado de daño histopatológico, específicamente con el grado de fibrosis, lo que permite distinguir a los pacientes con fibrosis más avanzada cuando los niveles de este miR están disminuidos⁶⁷. Por otra parte, se ha identificado que la expresión hepática del miR-21 aumenta en pacientes con EHGNA, correlacionando además con la gravedad de la misma⁶⁸.

Combinación de técnicas no invasivas

Con el objetivo de mejorar el rendimiento de los biomarcadores y las técnicas de imagen, ya algunos autores han propuesto la combinación de ambos como una herramienta útil en la valoración de la hepatopatía crónica. La combinación de 2 métodos no invasivos distintos implica un enfoque más amplio y probablemente más adecuado, ya que a la hora de intentar limitar el número de biopsias realizadas, el hecho de utilizar de forma conjunta 2 métodos complementarios con bases biológicas diferentes supone una ventaja

frente al uso de técnicas individuales y aumenta la seguridad diagnóstica.

Un estudio de Crespo et al.⁶⁹ demostró que la combinación sincrónica de ELF con Arfi o Fibroscan aumenta los valores predictivos, tanto positivos como negativos, de los métodos individuales en la detección de fibrosis significativa y cirrosis en pacientes trasplantados y no trasplantados con hepatopatía crónica de diversa etiología.

También los estudios realizados en pacientes con hepatopatía crónica por virus C han señalado que la combinación de biomarcadores y técnicas de imagen supone un aumento del rendimiento diagnóstico frente al uso de las técnicas de manera individual en la detección de fibrosis^{70,71}.

Discusión y conclusiones

La EHGNA es uno de los trastornos hepáticos crónicos más frecuentes en la actualidad, y con una incidencia creciente fuertemente ligada a la epidemia de obesidad existente en muchos países occidentales. La EHGNA se asocia con un aumento de la mortalidad por causas hepáticas y eventos cardiovasculares, y el riesgo es más alto en aquellos pacientes con esteatohepatitis y fibrosis avanzada.

Dentro de las opciones diagnósticas para la EHGNA los biomarcadores pueden considerarse los candidatos ideales. La principal ventaja frente a la biopsia, además de la obvia ausencia de invasividad, es la posibilidad de realizarlos de forma periódica, lo que permite un control evolutivo y continuo, ofreciendo una visión dinámica de la enfermedad. Esto supone la oportunidad de realizar una evaluación no invasiva, más continua y probablemente más fiel que el actual método de referencia. Sin embargo, aunque en principio estas características conviertan a los biomarcadores en una opción muy conveniente para la valoración de la EHGNA, existen varios puntos críticos que dificultan su implementación en la práctica clínica habitual, especialmente de los biomarcadores más novedosos.

Una de las limitaciones existentes a la hora de la normalización del uso de los biomarcadores en la valoración de la EHGNA radica en la incertidumbre sobre qué punto de la enfermedad debe detectarse exactamente. Inicialmente la mayoría de los estudios estaban planteados con el objetivo de detectar fibrosis, pero a medida que ha avanzado el conocimiento en la fisiopatología de la enfermedad, la esteatohepatitis ha ganado importancia, convirtiéndose en el objetivo diagnóstico. La ausencia de una referencia clara sobre el punto de la enfermedad que debe detectarse, ha originado que las investigaciones hayan ido por caminos relativamente diferentes, lo que implica resultados muy heterogéneos, cuyo contraste y comparación es difícil.

Por otro lado, tal como se muestra en esta revisión, hasta la actualidad son múltiples las moléculas que se han evaluado como posibles biomarcadores para el manejo de la EHGNA, obteniendo en muchos casos buenos resultados. Sin embargo, existen muchas lagunas en cuanto a los puntos de corte que deben utilizarse en la evaluación de la enfermedad, así como en referencia a los niveles normales de estos biomarcadores en individuos sanos dependiendo del sexo, etnia, edad, estado nutricional y comorbilidades. Además, de muchos de estos biomarcadores que no se utilizan todavía en la práctica clínica no se dispone de estándares

de referencia, lo que implica que ante el uso de diferentes técnicas los resultados aportados puedan discrepar de manera significativa, lo que dificulta mucho las comparaciones entre estudios y por tanto su implementación en la práctica asistencial.

Estas son las razones por las que actualmente el seguimiento de la mayoría de los pacientes con EHGA se realiza con biomarcadores clásicos de función hepática y, en algunos casos, con biomarcadores de fibrosis, de manera aislada o combinados mediante algoritmos matemáticos. Los biomarcadores que valoran la función hepática tienen la ventaja obvia de estar disponibles en la mayoría de los laboratorios, aunque sin embargo, tal como ya se ha explicado, carecen de la especificidad suficiente para caracterizar la lesión hepática de estos pacientes y de la sensibilidad necesaria para detectar estadios iniciales de la enfermedad. En nuestra opinión, a día de hoy la mejor opción sería la utilización de algoritmos matemáticos, que mejoran el rendimiento diagnóstico frente al uso de biomarcadores individuales. Por otra parte creemos que la combinación de los biomarcadores con otra técnica no invasiva, como los estudios radiodiagnósticos, implica un enfoque más amplio y probablemente más adecuado a la hora de intentar limitar el número de biopsias realizadas, suponiendo un modelo diagnóstico apropiado.

Por tanto, la investigación futura tiene como reto fundamental determinar qué biomarcadores pueden establecerse como una opción fiable y precisa para la evaluación de la EHGA, mediante el uso de estudios metodológicamente armonizados para poder asegurar la replicación independiente de los resultados. Además, una mayor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad permitirá identificar nuevos biomarcadores.

Conflicto de intereses

Los autores declaran la ausencia de conflicto de intereses en relación con el artículo publicado.

Bibliografía

1. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2011;9:524–30.
2. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Castiglione A, Crocè LS, Tiribelli C, et al. Incidence and natural course of fatty liver in the general population: The Dionysos study. *Hepatol Baltim Md.* 2007;46:1387–91.
3. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: The Dionysos nutrition and liver study. *Hepatol Baltim Md.* 2005;42:44–52.
4. Day CP, James OF. Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998;114:842–5.
5. Schwenger KJP, Allard JP. Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:1712–23.
6. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis.* 2007;11:1–16.
7. Solís-Herruzo JA, Solís-Muñoz P. [Genetic factors in non-alcoholic fatty liver disease]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008;100:195–201.
8. Nalbantoglu ILK, Brunt EM. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:9026–37.
9. Baršić N, Lerotić I, Smirčić-Duvnjak L, Tomašić V, Duvnjak M. Overview and developments in noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18:3945–54.
10. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2017;37 Suppl 1:85–9.
11. Mishra P, Younossi ZM. Abdominal ultrasound for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Am J Gastroenterol.* 2007;102:2716–7.
12. Festi D, Schiumerini R, Marzi L, di Biase AR, Mandolesi D, Montrone L, et al. Review article: The diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease-availability and accuracy of non-invasive methods. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;37:392–400.
13. Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, Stoker J. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: A meta-analysis. *Eur Radiol.* 2011;21:87–97.
14. Chen J, Talwalkar JA, Yin M, Glaser KJ, Sanderson SO, Ehman RL. Early detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography. *Radiology.* 2011;259:749–56.
15. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: A role for insulin resistance and diabetes. *Hepatol Baltim Md.* 2008;48:792–8.
16. Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2014;28:607–18.
17. Wilkins T, Tadkod A, Hepburn I, Schade RR. Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnosis and management. *Am Fam Physician.* 2013;88:35–42.
18. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatol Baltim Md.* 2007;45:846–54.
19. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med.* 2011;43:617–49.
20. Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, Gogia S, Neuschwander-Tetri BA. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut.* 2008;57:1441–7.
21. Tapper EB, Krajewski K, Lai M, Challies T, Kane R, Afdhal N, et al. Simple non-invasive biomarkers of advanced fibrosis in the evaluation of non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Rep.* 2014;2:276–80.
22. Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, Fujii H, et al. Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:2.
23. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European liver fibrosis panel and exploring simple markers. *Hepatol Baltim Md.* 2008;47:455–60.
24. Kaswala DH, Lai M, Afdhal NH. Fibrosis assessment in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in 2016. *Dig Dis Sci.* 2016;61:1356–64.
25. Calès P, Lainé F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, et al. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol.* 2009;50:165–73.
26. Ratzliff V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:6.

27. Enomoto H, Bando Y, Nakamura H, Nishiguchi S, Koga M. Liver fibrosis markers of nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2015;21:7427–35.
28. Chen C, Schmilovitz-Weiss H, Liu X, Pappo O, Halpern M, Sulkes J, et al. Serum protein N-glycans profiling for the discovery of potential biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis. *J Proteome Res.* 2009;8:463–70.
29. Vanderschaeghe D, Laroy W, Sablon E, Halfon P, van Hecke A, Delanghe J, et al. GlycoFibroTest is a highly performant liver fibrosis biomarker derived from DNA sequencer-based serum protein glycomics. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2009;8:986–94.
30. Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, et al. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2012;56:1448–56.
31. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1372–9.
32. Haukeland JW, Damås JK, Konopski Z, Løberg EM, Haaland T, Goverud I, et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol.* 2006;44:1167–74.
33. Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, et al. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2006;26:39–45.
34. Genc H, Dogru T, Kara M, Tapan S, Ercin CN, Acikel C, et al. Association of plasma visfatin with hepatic and systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2013;12:548–55.
35. Kowdley KV, Belt P, Wilson LA, Yeh MM, Neuschwander-Tetri BA, Chalasani N, et al. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;55:77–85.
36. Targher G. Relationship between high-sensitivity C-reactive protein levels and liver histology in subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2006;45:879–81.
37. Walenbergh SMA, Houben T, Rensen SS, Bieghs V, Hendriks T, van Gorp PJ, et al. Plasma cathepsin D correlates with histological classifications of fatty liver disease in adults and responds to intervention. *Sci Rep.* 2016;6:38278.
38. Kwok R, Tse YK, Wong GLH, Ha Y, Lee AU, Ngu MC, et al. Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease-the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39:254–69.
39. Cusi K, Chang Z, Harrison S, Lomonaco R, Bril F, Orsak B, et al. Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2014;60:167–74.
40. Lemoine M, Ratzliff V, Kim M, Maachi M, Wendum D, Paye F, et al. Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2009;29:1431–8.
41. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395:763–70.
42. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996;334:292–5.
43. Le D, Marks D, Lyle E, Corless CL, Diggs BS, Jobe BA, et al. Serum leptin levels, hepatic leptin receptor transcription, and clinical predictors of non-alcoholic steatohepatitis in obese bariatric surgery patients. *Surg Endosc.* 2007;21:1593–9.
44. Pirvulescu I, Gheorghe L, Csiki I, Becheanu G, Dumbravă M, Fica S, et al. Noninvasive clinical model for the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis in overweight and morbidly obese patients undergoing bariatric surgery. *Chir Buchar Rom* 1990. 2012;107:772–9.
45. Charlton M, Angulo P, Chalasani N, Merriman R, Viker K, Charatcharoenwitthaya P, et al. Low circulating levels of dehydroepiandrosterone in histologically advanced nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2008;47:484–92.
46. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27:412–21.
47. Zou CC, Liang L, Hong F, Fu JF, Zhao ZY. Serum adiponectin, resistin levels and non-alcoholic fatty liver disease in obese children. *Endocr J.* 2005;52:519–24.
48. Boyraz M, Cekmez F, Karaoglu A, Cinaz P, Durak M, Bideci A. Serum adiponectin, leptin, resistin and RBP4 levels in obese and metabolic syndrome children with nonalcoholic fatty liver disease. *Biomark Med.* 2013;7:737–45.
49. Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1497–502.
50. Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab.* 2004;30:121–38.
51. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quiñones L, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2004;106:261–8.
52. Sarıçam T, Kircali B, Köken T. Assessment of lipid peroxidation and antioxidant capacity in non-alcoholic fatty liver disease. *Türk J Gastroenterol Off J Turk Soc Gastroenterol.* 2005;16:65–70.
53. Orellana M, Rodrigo R, Varela N, Araya J, Poniachik J, Csendes A, et al. Relationship between in vivo chlorzoxazone hydroxylation, hepatic cytochrome P450 2E1 content and liver injury in obese non-alcoholic fatty liver disease patients. *Hepatology Res Off J Jpn Soc Hepatol.* 2006;34:57–63.
54. Barr J, Vázquez-Chantada M, Alonso C, Pérez-Cormenzana M, Mayo R, Galán A, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based parallel metabolic profiling of human and mouse model serum reveals putative biomarkers associated with the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res.* 2010;9:4501–12.
55. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarthy S, McCullough AJ, Hanson RW, et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2011;60:404–13.
56. Li H, Wang L, Yan X, Liu Q, Yu C, Wei H, et al. A proton nuclear magnetic resonance metabolomics approach for biomarker discovery in nonalcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res.* 2011;10:2797–806.
57. Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, Del Giacco L, Schlauch K, Born TL, et al. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:665–74.
58. Trak-Smayra V, Dargere D, Noun R, Albuquerque M, Yaghi C, Gannagé-Yared M-H, et al. Serum proteomic profiling of obese patients: correlation with liver pathology and evolution after bariatric surgery. *Gut.* 2009;58:825–32.
59. Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W. Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver Transplant.* 2008;14:688–94.
60. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2004;22:625–34.
61. Miller MH, Walsh SV, Atrih A, Huang J TJ, Ferguson MAJ, Dillon JF. Serum proteome of nonalcoholic fatty liver disease: A multimodal approach to discovery of biomarkers of nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29:1839–47.

62. Marzuillo P, Grandone A, Perrone L, Miraglia del Giudice E. Understanding the pathophysiological mechanisms in the pediatric non-alcoholic fatty liver disease: The role of genetics. *World J Hepatol.* 2015;7:1439–43.
63. Xu R, Tao A, Zhang S, Deng Y, Chen G. Association between patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) polymorphisms and nonalcoholic fatty liver disease: A HuGE review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2015;5: 9284.
64. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Genetic factors in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver and steatohepatitis. *BioMed Res Int.* 2015;2015:460190.
65. Liu YL, Reeves HL, Burt AD, Tiniakos D, McPherson S, Leathart JBS, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun.* 2014;5:4309.
66. Zeybel M, Hardy T, Robinson SM, Fox C, Anstee QM, Ness T, et al. Differential DNA methylation of genes involved in fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Clin Epigenetics.* 2015;7:25.
67. Lee J, Kim Y, Friso S, Choi SW. Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Aspects Med.* 2017;54:78–88.
68. Pirola CJ, Fernández Gianotti T, Castaño GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: From serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut.* 2015;64:800–12.
69. Crespo G, Fernández-Varo G, Mariño Z, Casals G, Miquel R, Martínez SM, et al. ARFI, FibroScan, ELF, and their combinations in the assessment of liver fibrosis: A prospective study. *J Hepatol.* 2012;57:281–7.
70. Castéra L, Sebastiani G, Le Bail B, de Lédinghen V, Couzigou P, Alberti A. Prospective comparison of two algorithms combining non-invasive methods for staging liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2010;52:191–8.
71. Takaki S, Kawakami Y, Miyaki D, Nakahara T, Naeshiro N, Murakami E, et al. Non-invasive liver fibrosis score calculated by combination of virtual touch tissue quantification and serum liver functional tests in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol.* 2014;44:280–7.